

REC'D 15 NOV 00

WIPO

PCT

PCT/JP00/06513

日 本 国 特 許 庁 22.09.00

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1999年 9月27日

出 願 番 号
Application Number:

平成11年特許願第272092号

出 願 人
Applicant(s):

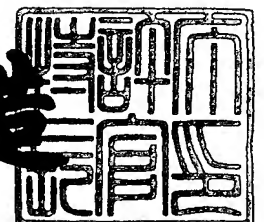
国際試薬株式会社

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年10月27日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2000-3087602

【書類名】 特許願
 【整理番号】 DP99-1064
 【あて先】 特許庁長官殿
 【国際特許分類】 C12N 9/74
 【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市西区室谷 1 丁目 1 - 2

国際試薬株式会社 研究開発センター内

【氏名】 奥田 昌宏

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市西区室谷 1 丁目 1 - 2

国際試薬株式会社 研究開発センター内

【氏名】 菊川 紀弘

【特許出願人】

【識別番号】 000170565

【氏名又は名称】 国際試薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100088904

【弁理士】

【氏名又は名称】 庄司 隆

【電話番号】 03-3864-6572

【選任した代理人】

【識別番号】 100107939

【弁理士】

【氏名又は名称】 大島 由美子

【電話番号】 03-3864-6538

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 067070

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9815836

【包括委任状番号】 9901104

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 トロンビンの安定化手段及び組成物

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 少なくともカルシウムイオンの安定化有効量を含むことを特徴とするトロンビンの安定化手段。

【請求項 2】 少なくともカルシウムイオンおよび水溶性有機酸の安定化有効量を含むことを特徴とするトロンビンの安定化手段。

【請求項 3】 少なくとも請求項 1 又は請求項 2 記載のトロンビンの安定化手段が導入されたトロンビン含有組成物。

【請求項 4】 測定再現性の確保のために、高分子多糖類及び合成高分子化合物から選ばれた 1 種又は 2 種以上を組み合わせる有効量を含むことを特徴とする請求項 3 に記載のトロンビン含有組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、トロンビンの安定化手段及び安定化されたトロンビン含有組成物に関する。さらに詳しくは、臨床検査の分野において用いられるトロンビン試薬の安定化手段及び安定化されたトロンビンを含む診断薬に関する。

【0002】

【従来の技術】

フィブリノゲンをフィブリンに変換する酵素であるトロンピンは血液凝固反応過程で非常に重要な役割を担っている。臨床検査の分野においては、トロンピンを用いてフィブリノゲン濃度を測定したり、トロンピン阻害物質の活性、例えば、アンチトロンピン I I I 活性、ヒルジンの活性、更に化学合成阻害剤の活性を測定するために多く用いられている。

【0003】

しかしながら、一般にトロンピンは不安定であるため通常、長期間保存する場合には凍結乾燥処理を施して保存していた。

【0004】

トロンビンを安定化させる試みは現在まで数多く行われてきた。例えば、特開昭56-39782号公報、特公平3-76292号公報、特開平1-93536号公報、特開平2-53732号公報、特開昭64-40433号公報、特開平7-33799号公報、特開平9-328436号公報、特公平8-13750号公報、特開平7-165604号公報、特公平7-64747号公報、特開昭63-192723号公報、特開平4-320683号公報、特公昭58-26956号公報、特開平10-52267号公報、特開昭60-1112721号公報、特開昭56-68607号公報にその例を見ることができる。

【0005】

これらの何れも、完全なものではなく、とりわけ臨床検査診断薬に用いるには十分な安定性を示すには至っていない。

【0006】

他方、測定試薬に用いられるトロンビンは、一般にヒト又は動物由来のトロンビンを適当な緩衝液や安定化剤の含まれた溶液中に、目標とする力価となるように調製され、溶液又は凍結乾燥品として保存、使用される。調製されたトロンビン試薬は、前述のごとく様々な目的に用いられるが、何れの場合にも、最終的にトロンビン自身の活性を測定することによりその目的を達成している。

【0007】

トロンビンの活性の測定には、人工合成基質を用いた測定法と天然の基質であるフィブリノゲンを用いた方法が一般的である。前者は比色分析が通常であり、後者は凝固時間分析が一般的である。後者の凝固時間分析法は、その検出手段として、散乱光や透過光の変化を検出することにより凝固時間を求める方法や、凝固形成により球の移動ができなくなることを検出することにより凝固時間を求める物理的方法等が知られている。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

これらの検出方法による凝固時間測定の最大の課題は、測定の再現性が悪いことであった。トロンビンの活性測定法であるフィブリノゲンのフィブリンへの変換反応は液相反応から固相へ移行する反応であり、反応条件すなわちpHやイオ

ン強度等により大きく変動することが知られている。これら反応条件の影響により、再現性が悪くなっていた。そこで、液状で安定なトロンピンを用いた、反応条件の影響を受けない、再現性の良い測定系の構築が待ち望まれていた。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは鋭意研究を重ねた結果、トロンピンに、カルシウムイオンを、又はカルシウムイオンと水溶性有機酸とを混合して、含ませることにより、溶液状態、凍結乾燥品又は、凍結乾燥処理した後再溶解させた溶液いずれにおいてもトロンピンの失活が防げることを見出した。さらにこの安定化手段に加えて高分子多糖類及び合成高分子化合物から選ばれる一種又は二種以上を混合して含ませることにより、測定再現性の良好なトロンピン試薬が調製できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0010】

すなわち、本発明は、少なくともカルシウムイオンの安定化有効量を含有することを特徴とするトロンピンの安定化手段；少なくともカルシウムイオンおよび水溶性有機酸の安定化有効量を含有することを特徴とするトロンピンの安定化手段；少なくとも本発明のトロンピンの安定化手段が導入されたトロンピン含有組成物；測定再現性の確保のために、高分子多糖類及び合成高分子化合物から選ばれた一種又は二種以上を組み合わせる有効量を含有させることを特徴とする本発明のトロンピン含有組成物、である

【0011】

【発明の実施の形態】

以下、本発明をさらに詳しく説明する。

(トロンピン)

安定化させるトロンピンは動物由来、ヒト血漿由来さらには遺伝子組換えで調製されたもののいずれでも適用可能であり、溶液中のトロンピン活性は目的とする活性値に調整されていれば、特にその濃度は限定されない。

【0012】

(カルシウムイオン)

トロンビンの安定化剤として添加されるカルシウムイオンは、塩化カルシウム、乳酸カルシウム、グルコン酸カルシウム、酒石酸カルシウム等、水溶性のカルシウム化合物を例示することができ、その一種もしくは二種以上を組み合わせることも可能である。

【0013】

その添加量は、液状溶解時における終濃度が、5 mM～100 mMになるように添加されていることが好適で、より好ましくは15 mM～50 mMで用いる。トロンビンの液状製剤にあっては、液状製剤中に上記の濃度で含有され、乾燥製剤又は凍結乾燥製剤にあっては、最終的な液状品における終濃度が上記の濃度になるように所望の溶解液量に依存して調整され含有される。

【0014】

(有機酸)

有機酸は、水溶性のものが用いられ、ぎ酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸、蔞酸、マロン酸、コハク酸、グルコン酸、乳酸、グルクロン酸、グリコール酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸、酒石酸、グルタル酸、アミノ酢酸、アミノカプロン酸等を例示することができる。

【0015】

その添加量は、液状溶解時における終濃度が、10 mM～500 mMになるように添加されていることが好適で、より好ましくは50 mM～200 mMで用いる。これらの有機酸は、遊離酸もしくはナトリウム塩等のどちらで用いても良い。さらに有機酸は、二種以上を組み合わせる用いても良い。

【0016】

(再現性向上添加物)

測定の再現性向上のために添加される高分子多糖類としては、デキストラン40、デキストラン70、デキストラン200、000、デキストラン500、000、フィコール等、合成高分子化合物としては、ポリビニルアルコール500、ポリビニルアルコール1500、ポリビニルアルコール2000、ポリエチレングリコール1500、ポリエチレングリコール2000、ポリエチレングリコール4000、ポリエチレングリコール6000、ポリエチレングリコール80

00、ポリエチレングリコール20000およびポリビニルピロリドン等を挙げる
ことができる。しかし、同等物であって、測定の再現性向上が達成される限りは
これらに限定されるものではない。

【0017】

高分子多糖類もしくは合成高分子化合物は、液状溶解時における終濃度が、1
～10重量/容量%となるように添加されていることが好適で、より好ましくは
1～3重量/容量%で用いられる。これらの高分子物質は単独もしくは二種以上
を組み合わせて用いることができる。

【0018】

(緩衝液)

トロンビン組成物は溶液状態において、通常緩衝液中に含まれる。その種類は
、pH4～9の範囲に緩衝能をもつ緩衝剤を適宜選択して用いる。例えば、HE
PES、MOPS、BIS-TRIS、TRIS、MOPSO、ADA、MES
、等から一種もしくは二種以上が選ばれて用いられる。またトロンビン組成物に
は適当な防腐剤を添加することもできる。防腐剤としては、シプロフロキサシン
、プロピオン酸もしくは安息香酸ナトリウム等の中から一種もしくは二種以上が
選択され用いられる。また、必要に応じて食塩等の塩やアルブミンやその他の蛋
白質等、及び安定化剤等、を含ませることもできる。

【0019】

(具体的な液状組成物の調製例)

具体的には5mM～25mMの緩衝液に10mM～20mMのカルシウムイオ
ン、例えば乳酸カルシウム、及び有機酸、例えば酢酸を50mM～150mM加
え、更に高分子化合物、例えばポリビニルアルコール500を2～3重量/容量
%添加する。防腐剤を添加した後、溶液のpHを6～7付近に調整して母液を調
製する。その母液に目的とする濃度又は活性量のトロンビンを溶解し、トロンビ
ン溶液を調製する。その溶液を適当な孔径のフィルターで濾過することもある。
製剤は、そのまま液状試薬としてあるいは凍結乾燥処理して乾燥製剤試薬として
使用に提供される。

【0020】

以下に実施例を挙げて本発明を更に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【実施例】

【0021】

〔実施例1〕

20 mMのHEPES緩衝液、pH 6.0（無添加溶液）、同緩衝液に25 mMの乳酸カルシウムを加えた溶液（Ca添加溶液）、20 mMのHEPES緩衝液に100 mMの酢酸を加えpH 6.0に調整した溶液（酢酸添加溶液）および、酢酸添加溶液に25 mMの乳酸カルシウムを加えた（両方添加溶液）の4種類の溶液を調製し、それぞれにヒトトロンビンを100単位/mlとなるように添加しトロンビン溶液を調製した。調製したトロンビン溶液に防腐剤としてシプロフロキサシン0.1重量/容量%を加え0.22 μ mのフィルターで除菌ろ過後、ガラス瓶に3 mlずつ分注し、密栓後25℃で保存した。調製直後、1、2、3、4、5および6月後のトロンビンの残存活性を測定し、トロンビンの安定化効果を調べた。その結果を表1に示した。

【0022】

【表1】（トロンビンの残存活性：25℃保存）

（単位：%）

| | 保存期間 | | | | | | |
|-------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 調製直後 | 1月後 | 2月後 | 3月後 | 4月後 | 5月後 | 6月後 |
| 無添加 | 100 | 89 | 84 | 57 | 35 | 17 | 8 |
| Ca 添加 | 100 | 93 | 90 | 88 | 83 | 81 | 72 |
| 酢酸添加 | 100 | 97 | 93 | 89 | 85 | 82 | 74 |
| 両方添加 | 100 | 100 | 101 | 98 | 100 | 97 | 102 |

【0023】

この結果、少なくともカルシウムを添加することによりトロンビンが安定化され、25℃で6月保存後でも72%の残存活性を保持していた。酢酸添加の効果は、特開昭56-39782に開示されている効果であるが、有機酸である酢酸

添加に加えてさらにカルシウムを添加することにより、より効果的に安定化され 25℃で6月保存後も全くその活性の低下は認められず、完全に安定化されることがわかった。

【0024】

〔実施例2〕

10 mMのHEPES緩衝液 (pH 7.0) に150 mMの食塩、0.1 重量/容量%の防腐剤であるアジ化ナトリウム、及び20 mM乳酸カルシウムを添加した溶液と無添加の溶液を調製した。その溶液にポリビニルアルコール205 (PVA 205)、ポリビニルアルコール500 (PVA 500)、およびポリビニルアルコール1500 (PVA 1500) をそれぞれ無添加、0.1、0.5、1、2、3 及び5 重量/容量%となるように添加した溶液を調製した。

【0025】

各溶液にトロンبینを100単位/mlとなるように溶解し、トロンبین溶液を調製した。調製した各トロンبین溶液を用いて、市販のコントロール血漿中フィブリノゲン能動の測定を行った。コントロール血漿をフィブリノゲン測定用緩衝液で10倍希釈したものを試料として、その100 μ l に上記調製したトロンبین試薬50 μ l を加え、37℃でその凝固するまでの時間を測定した。

【0026】

上記一連の操作は、全自動凝固分析装置コアグレックス700 (島津製作所製) を用いて行った。同一試料を同時に20回測定して得られた凝固時間をもとにその変動係数を求め再現性の比較を行った。その結果を表2に示す。さらに、カルシウム無添加の溶液、すなわち上記の各溶液から20 mM乳酸カルシウムを除いた溶液を調製して同様の検討を行い、カルシウムイオンの再現性への効果を調べた。

【0027】

【表2】 (ポリビニルアルコール添加トロンبین試薬の再現性)

(単位: CV%)

| 20 mM 乳酸カル シウム | PVA 種類 | ポリビニルアルコール (PVA) 濃度 | | | | | | |
|----------------------|---------|---------------------|------|------|------|------|------|------|
| | | 無添加 | 0.1% | 0.5% | 1% | 2% | 3% | 5% |
| 無添加 | PVA205 | 20.1 | 17.8 | 18.6 | 15.5 | 14.3 | 14.3 | 16.5 |
| | PVA500 | 22.3 | 15.0 | 17.8 | 15.3 | 14.1 | 14.8 | 16.7 |
| | PVA1500 | 20.6 | 19.3 | 17.5 | 14.7 | 15.2 | 14.2 | 17.8 |
| 添加 | PVA205 | 13.6 | 9.0 | 8.6 | 5.8 | 4.3 | 4.9 | 6.5 |
| | PVA500 | 16.3 | 5.0 | 7.8 | 5.0 | 4.1 | 4.8 | 6.7 |
| | PVA1500 | 15.6 | 9.0 | 7.5 | 3.7 | 6.5 | 7.1 | 7.8 |

【0028】

この結果から、乳酸カルシウムを20 mM添加したトロンビン溶液では変動係数が乳酸カルシウム無添加のトロンビン試薬よりも小さくなり、再現性が向上することがわかった。更にポリビニルアルコールを添加することにより再現性の向上がはかれることが判明し、1～3重量/容量%の濃度でその効果は最大になった。実施例1の結果と実施例2の結果より、カルシウムイオンはトロンビンの安定化効果と共に、再現性の向上に有効であることが判る。

【0029】

〔実施例3〕

ポリビニルアルコールに代えてデキストラン40 (Dex40)、デキストラン70 (Dex70)、デキストラン200,000 (Dex200)を用い、その濃度を0.1、0.5、1、3、5、6、8及び10重量/容量%とし、全てに20 mM乳酸カルシウムを含ませた以外はすべて実施例2と同様に操作して、再現性の比較を行った。その結果を表3に示した。

【0030】

【表3】 (カルシウム無添加のデキストラン添加トロンビン試薬の再現性)

(単位: CV%)

| Dex 種類 | デキストラン (Dex) 濃度 | | | | | | | | |
|--------|-----------------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 無添加 | 0.1% | 0.5% | 1% | 3% | 5% | 6% | 8% | 10% |
| Dex40 | 13.6 | 21.0 | 12.8 | 9.9 | 4.8 | 3.4 | 3.4 | 3.7 | 4.3 |
| Dex70 | 16.3 | 7.3 | 9.7 | 6.1 | 3.3 | 6.7 | 6.5 | 6.7 | 6.7 |
| Dex200 | 15.6 | 20.1 | 14.2 | 8.8 | 4.6 | 5.8 | 5.5 | 6.3 | 7.0 |

【0031】

この結果から、高分子多糖類であるデキストラン類を添加することにより再現性の向上がはかれることが判明し、1～10重量/容量%の濃度でその効果は最大であった。

【発明の効果】

以上説明したように、少なくともカルシウムの添加により、トロンビンが安定化され、さらに有機酸の補助添加により一層の安定化効果が得られた。カルシウムイオンはトロンビンの安定化効果と共に、再現性の向上に有効であることも判明した。また、高分子多糖類又は合成高分子化合物の添加により、測定系の再現性の向上がはかれることも判明し、それぞれ終濃度1～3重量/容量%又は1～10重量/容量%でその効果が最大になることがわかった。かくして、本発明からなるトロンビンの安定化手段及び安定化されたトロンビン含有組成物は、従来にないトロンビンの安定化手段を提供し、極めて有用な臨床検査用試薬組成物を提供するものである。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 トロンビンの安定化手段及び安定化されたトロンビン含有組成物の提供。

【解決手段】 カルシウムイオンを添加すること、又はカルシウムイオンと有機酸の両方を添加すること、によりトロンビンの安定化手段及び組成物を提供する。さらにこれらの安定化手段に加えて、高分子多糖類もしくは合成高分子化合物の 1 ～ 1 0 重量／容量％を一種または数種含有させることにより、トロンビンの安定性と測定再現性を極めて高くする手段及び組成物を提供する。

認 定 ・ 付 加 情 報

| | |
|---------|------------------------------|
| 特許出願の番号 | 平成 1 1 年 特許願 第 2 7 2 0 9 2 号 |
| 受付番号 | 5 9 9 0 0 9 3 5 3 4 3 |
| 書類名 | 特許願 |
| 担当官 | 第五担当上席 0 0 9 4 |
| 作成日 | 平成 1 1 年 9 月 3 0 日 |

< 認定情報・付加情報 >

| | |
|-------|--------------------|
| 【提出日】 | 平成 1 1 年 9 月 2 7 日 |
|-------|--------------------|

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000170565]

1. 変更年月日

1990年 8月21日

[変更理由]

新規登録

住 所

兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目1番30号

氏 名

国際試薬株式会社

